

基于 HPLC-DAD-MS 的道地产区大黄药材质量评价研究

张依倩^{1,2}, 王 玉¹, 黄芝娟¹, 张兰兰¹, 周水平¹, 李 萍^{2*}

1. 天士力集团研究院 现代中药研究所, 天津 300410

2. 中国药科大学 中药学院, 江苏 南京 211198

摘 要: **目的** 通过对 HPLC-DAD-MS 多种分析手段的联用, 建立大黄药材成分分析方法, 确认各个特征峰的归属, 从而定性定量的评价药材质量, 预测不同道地产区大黄药材的药效, 为谱效学研究提供基础研究。**方法** 以全国各道地产区大黄药材为研究对象, 采用 Agilent Zorbox C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈-0.1%磷酸水二元梯度洗脱模式, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长 280 nm, 建立了 20 批来自四川、青海、甘肃地区的大黄药材的 HPLC 图谱, 并通过 HPLC-DAD-MS 联用技术对其中 30 个特征峰进行了归属分类, 同时进行了各类指纹成分比较研究。**结果** 各地区间游离蒽醌量差异较小, 而其他成分差异明显, 表现出可能存在的质量差异。**结论** 本实验全面阐明了大黄药材的各主要化学成分及地区间差异, 方法样品处理简单, 建立的大黄分析方法稳定性、重复性好, 为大黄药材的质量评价提供较为充实的参考依据。

关键词: 道地产区; 大黄; HPLC-DAD-MS; 特征峰指认; 谱效学; 游离蒽醌

中图分类号: R282.710.3

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2011)03-0179-05

Quality evaluation studies on chromatography of *Rhei Radix et Rhizoma* from geo-authentic producing areas by HPLC-DAD-MS

ZHANG Yi-qian^{1,2}, WANG Yu¹, HUANG Zhi-juan¹, ZHANG Lan-lan¹, ZHOU Shui-ping¹, LI Ping²

1. Tasly Group Acedemy Institute of Modern TCM R&D, Tianjin 300410, China

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract: Objective To establish a stable chromatography method of ingredient analysis in the traditional Chinese medicinal materials (TCMM) *Rhei Radix et Rhizoma* using HPLC-DAD-MS, and identify the attribution of chromatographic peaks. By the chromatography method, the quality of TCMM *Rhei Radix et Rhizoma* was evaluated by the perspectives of both quality and quantity, and the medicinal effect of *Rhei Radix et Rhizoma* from different sources was predicted. This study could also provide thoughts and research foundation for chromatographic pharmacodynamics. **Methods** Agilent Zorbox C₁₈ column (250mm × 4.6 mm, 5 μm), with mixture of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid as mobile phase, flow rate 1.0 mL/min, detective wavelength 280 nm, was used to acquire HPLC chromatogram of 20 *Rhei Radix et Rhizoma* from different sources in Sichuan, Qinghai, and Gansu provinces. The 30 characteristic peaks were identified and classified using HPLC-DAD-MS and the quantity each various ingredients were compared in fingerprint in this study. **Results** The results showed that the difference of anthraquinone content from different intervals was not significant, but the significant differences existed in other components, which indicated the quality difference might exist. **Conclusion** With the simple sample treatment technique, the method of *Rhei Radix et Rhizoma* established is stable and repeatable, which provides a solid reference for the quality control of *Rhei Radix et Rhizoma*.

Key words: geo-authentic producing areas; *Rhei Radix et Rhizoma*; HPLC-DAD-MS; characteristic peak identification; chromatographic pharmacodynamics; anthraquinone

大黄为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、唐古特大黄 *R. tanguticum* Maxim. ex Balf. 或药用大黄 *R. officinale* Baill 的干燥根及根茎, 又名将军, 具泻热通便、凉血解毒、逐瘀通经的功效^[1-2], 是临

床最常用的药物之一, 主要含有蒽醌类及其衍生物、二蒽酮及其苷类、没食子酸酯、二苯乙烯苷类、鞣质类、苯基丁酮类等^[3-6]。大黄药材的质量直接关系到其制剂的质量, 目前对于不同产地、品种的大黄

收稿日期: 2011-03-12

作者简介: 张依倩 (1987—), 女, 在读硕士研究生, 从事中药质量评价研究。E-mail: 331835112@163.com

*通讯作者 李 萍 Tel: (025)83271379

药材研究已有多篇报道,但大多以游离蒽醌类成分作为考察指标,对其他特征峰不能进行明确的归属,未能揭示药材中各指纹成分的量变化,无法对其作出科学、系统的评价,而本实验 HPLC 图谱联用质谱定性定量方法的提出为大黄质量的评价提供了一条新思路。

1 仪器与试药

20 批大黄药材,分别从四川、甘肃、青海等地区以及河北安国中药材市场收集,所有样品经天津中医药大学李天祥教授鉴定为正品大黄,鉴定结果

及样品信息见表 1。

对照品没食子酸、儿茶素、大黄素、大黄酚、大黄酸、大黄素甲醚、芦荟大黄素(中国药品生物制品检定所),番泻苷 A、B、C、D、白藜芦醇(天津马克生物技术有限公司),大黄酸-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷(天津尖峰科技有限公司),4'-羟基苯基-2-丁酮(美国 Chromadex 公司),大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、大黄酚-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷(自制,经 MIR 鉴定,质量分数>95%),乙腈(美国 Merck 公司,色谱纯),水为二次蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

表 1 大黄药材信息和鉴定结果
Table 1 Information and identification of *Rhei Radix et Rhizoma*

编 号	种 属	种植方式	产 地	采集地点
S1	唐古特大黄 <i>R. tanguticum</i> Maxim. ex Balf.	基地栽培	青海	青海果洛州
S2		家养	青海	河北安国中药材市场
S3		家养	青海	天津市北京同仁堂药业
S4		家养	甘肃	成都荷花池中药材市场
S5		家养	甘肃	成都荷花池中药材市场
S6		家养	甘肃	南京先声药业
S7		家养	甘肃	河北安国中药材市场
S8	唐古特大黄 <i>R. tanguticum</i> Maxim. ex Balf.	基地栽培	四川	四川阿坝州松潘县
S9		基地栽培	四川	四川阿坝州松潘县
S10		基地栽培	四川	四川阿坝州松潘县
S11		基地栽培	四川	四川阿坝州松潘县
S12		基地栽培	四川	四川阿坝州松潘县
S13		野生	四川	四川阿坝州松潘县
S14		野生	四川	四川阿坝州松潘县
S15		野生	四川	四川阿坝州松潘县
S16		野生	四川	四川阿坝州松潘县
S17		野生	四川	四川阿坝州松潘县
S18		家养	四川	四川阿坝州松潘县
S19		基地栽培	四川	四川阿坝州若尔盖县
S20	药用大黄 <i>R. officinale</i> Baill.	基地栽培	四川	四川阿坝州茂县

Agilent 1100 高效液相色谱仪,配有二元高压梯度泵、自动进样器、柱温箱及二极管阵列检测器(DAD); Agilent 色谱工作站。Agilent 1100 series LC-MSD 液质联用仪,包括 Agilent SL 型多级离子阱质谱仪、低压四元梯度泵、二极管阵列检测器(DAD)、自动进样、柱温箱、Chemstation 化学工作站等。BP211D 型十万分之一电子天平(北京赛多利斯天平有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Zorbox C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,

5 μm)色谱柱。流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水(B),梯度洗脱。梯度洗脱程序: 0 min(10% A)→50 min(27% A)→55 min(27% A)→78 min(53% A)→83 min(80% A)→93 min(80% A); 体积流量为 1.0 mL/min,检测波长为 280 nm,190~500 nm 全波长扫描,柱温 30 ℃,进样量为 10 μL。分析时间为 93 min,计算大黄素的理论塔板数不低于 5 000。

质谱检测器工作参数: 源喷雾电压 - 3.0 kV; 离子传输毛细管温度 350 ℃; 鞘气(氮气)压力 2.07×10⁵ Pa; 辅助气压力 3.45×10⁴ Pa; 离子检测方式 ESI⁻全扫描; 离子扫描范围 *m/z* 100~2 000。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取上述对照品适量, 分别用甲醇溶解, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

称取大黄粉末约 1.00 g, 加甲醇 - 0.2% Na_2CO_3 (80:20) 50 mL, 摇匀, 浸泡 30 min, 超声提取 20 min, 补足质量, 静置, 上清液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 HPLC-DAD-MS² 特征峰归属

结合二极管阵列检测器 (DAD) 联用 ESI-MS

技术, 对大黄药材 HPLC 图谱中各特征峰进行质谱测定鉴定。15 号样品的 HPLC 图谱及其总离子流图见图 1。

总结上述数据, 根据 HPLC 色谱成分的紫外吸收光谱、质谱碎片及提取离子流结果, 结合文献对大黄药材中成分的研究报道^[7-11]对指纹图谱中峰面积较大的 30 个特征峰 (图 2) 进行归属指认, 这些成分分属于 7 类: 没食子酸及其酰基糖苷类 (I), 鞣质类 (II), 二苯乙烯苷类 (III), 苯丁酮类 (IV), 蒽醌苷类 (V), 番泻苷类 (VI) 和游离蒽醌类 (VII)。

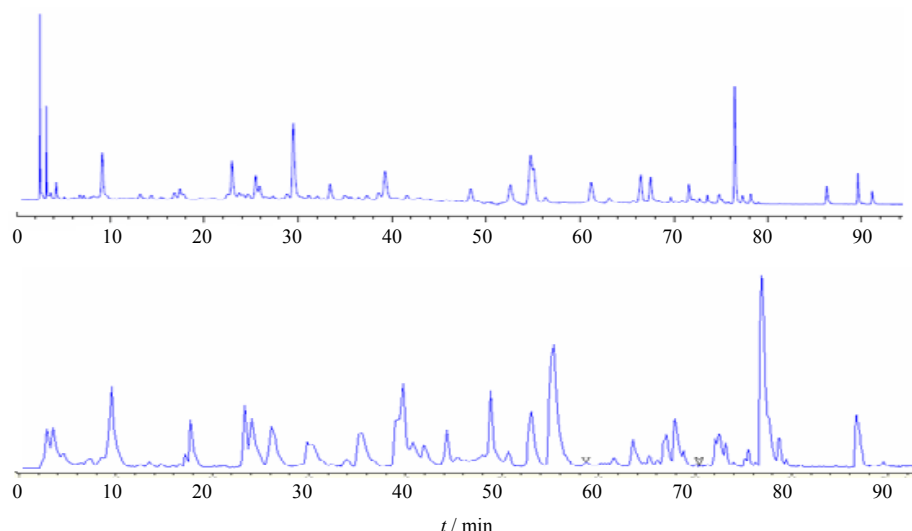


图 1 15 号样品的 HPLC 图谱及其总离子流图

Fig. 1 HPLC (A) and total ion-current (B) chromatogram of sample 15

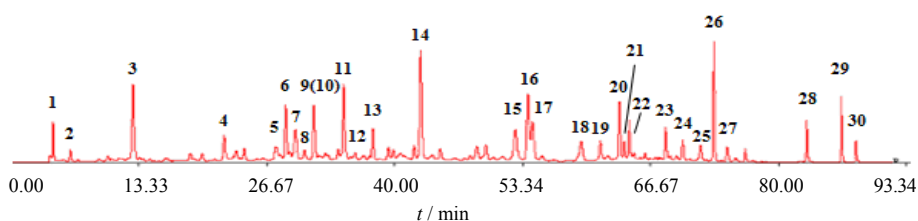


图 2 HPLC-DAD-MS 指认大黄图谱特征峰

Fig. 2 Chromatographic peaks of *Rhei Radix et Rhizoma* by HPLC-DAD-MS

通过对照品保留时间和紫外光谱比对, 指出其中 1 号峰为没食子酸 (I), 3 号峰为儿茶素 (II), 7 号峰为表儿茶素没食子酸酯 (II), 8 号峰为番泻苷 D (VI), 9 号峰为大黄酸-8-*O*- β -D-葡萄糖苷 (V), 10 号峰为番泻苷 B (VI), 12 号峰为番泻苷 C (VI), 13 号峰为番泻苷 A (VI), 16 号峰为大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷 (V), 17 号峰为大黄酚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷 (V), 25 号峰为芦荟大黄素 (VII), 27 号峰为

大黄酸 (VII), 28 号峰为大黄素 (VII), 29 号峰为大黄酚 (VII), 30 号峰为大黄素甲醚 (VII)。其他特征峰信息归属结果见表 2。

再分别以没食子酸、儿茶素、白藜芦醇、4'-羟基苯基-2-丁酮、大黄酸-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、番泻苷 A 和大黄酸为对照, 在同波长下 (280 nm) 计算各类成分的相对量, 考察不同产地大黄药材中这 7 类成分之间的差异及相关性, 以雷达图显示, 见图 3。

表 2 HPLC-DAD-MS 指认指纹图谱特征峰归属
Table 2 Fingerprint chromatographic peaks regulation by HPLC-DAD-MS

峰号	$\lambda_{\max}/\text{nm}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	MS^2	可能结构	归属类
2	270	483	331, 169, 125	2- <i>O</i> -没食子酰基糖苷	I
4	215, 310	389	227	白藜芦醇苷	III
5	220, 275	477	313, 169	4'-羟苯基-2-丁酮酰基糖苷类	IV
6	225, 260	431	269	蒽醌苷类	V
11	220, 300	541	313, 227, 169, 125	白藜芦醇没食子酰基糖苷	III
14	220, 280	461	313, 169	没食子酰-肉桂酰糖苷	I
15	225, 260	431	268, 169	蒽醌苷类	V
18	270	613	461, 271, 169, 147, 125	二没食子酰-肉桂酰糖苷	I
19	225, 260	401	283, 147	蒽醌苷类	V
20	225, 265	687	459, 315, 283	蒽醌苷类	V
21	220, 280	623	459, 295, 169	4'-羟苯基-2-丁酮苯并吡喃糖苷	IV
22	225, 260	489	283, 242	蒽醌苷类	V
23	225, 265	491	389, 307, 283	蒽醌苷类	V
24	215, 280	671	443	4'-羟苯基-2-丁酮酰基糖苷类	IV
26	220, 275	607	443, 295, 169, 125	4'-羟苯基-2-丁酮肉桂酰没食子酰基糖苷	IV

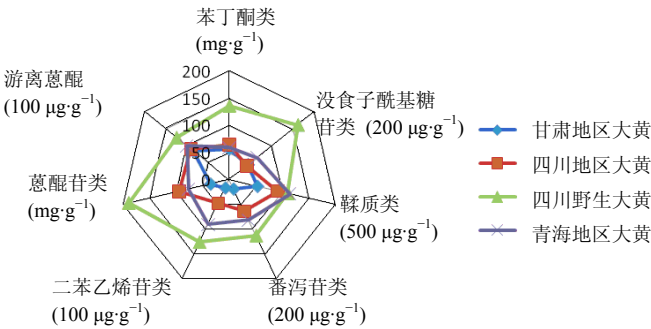


图 3 不同产地大黄药材 7 类特征成分差异雷达图

Fig. 3 Radar graph of difference for seven characteristic components in *Rhei Radix et Rhizoma* from defferent sources

2.4.1 没食子酸及其糖苷类 色谱峰 2 号 $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 483, 产生了 m/z 331, 169 碎片, m/z 169 为没食子酸结构碎片, 其可推测为 m/z 483 脱掉一分子葡萄糖成为 m/z 331 后, 再脱掉一分子葡萄糖所致, 同时符合没食子酸单元结构的特征裂解途径 m/z 169→125, 故初步推测其为二没食子酰葡萄糖。色谱峰 18 号除了有没食子酸结构单元外, 亦存在 m/z 147 的肉桂酸结构单元, 因此推断色谱峰 18 号为二没食子酰-肉桂酰葡萄糖类结构。同理, 推测色谱峰 14 号为没食子酰-肉桂酰葡萄糖苷。

2.4.2 二苯乙烯苷类 色谱峰 4 号的一级质谱扫描图可知其 $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 389, 进一步产生碎片 m/z 227, 推测为脱掉一分子葡萄糖结构后残留的白藜芦醇结构单元, 故推测色谱峰 4 号可能为白藜芦醇葡萄糖。同样, 色谱峰 11 号较色谱峰 4 号多出一个

m/z 313 碎片, 可能为脱掉一分子白藜芦醇结构单元后的没食子酰基糖苷, 故色谱峰 11 号推测为白藜芦醇没食子酰葡萄糖。

2.4.3 苯丁酮类 已知 4'-羟苯基-2-丁酮的碎片为 m/z 163, 而 m/z 443, 295, 169 均为一系列物质脱掉 4'-羟苯基-2-丁酮碎片后产生的糖苷类碎片, 故推测色谱峰 5、14、21、24、26 号均为 4'-羟苯基-2-丁酮葡萄糖。结合文献报道的特征裂解碎片^[12], 推测色谱峰 21 号为 4'-羟苯基-2-丁酮苯并吡喃糖苷, 色谱峰 26 号为 4'-羟苯基-2-丁酮肉桂酰没食子酰基糖苷。

2.4.4 蒽醌苷类 m/z 283 为大黄酸和大黄素甲醚的准分子离子峰, m/z 269 为大黄素和芦荟大黄素, 没有进一步的特征裂解碎片, 不能明确归属, 结合蒽醌结构的紫外特征吸收图谱, 推测色谱峰 6、15、19、20、22、23 号为蒽醌葡萄糖苷类物质。

3 讨论

采用二极管阵列检测器做全波长扫描,考察不同吸收波长下的图谱,重点考察了230、254、270、280、300 nm处的图谱特征。结果表明280 nm处各成分具有较好的紫外吸收,色谱信息最为丰富,基线平稳。

实验过程中对其甲醇、丙酮、水和甲醇-水、丙酮-水不同比例的混合液提取物分别进行考察,结果显示甲醇-水(80:20)提取物出峰较好,考虑到大黄中已报道的各类有效成分多为弱酸性物质,故参照日本药局方之本法^[13],选择弱碱性提取溶剂进行优化,最终确定实验中样品均采用甲醇-0.2% Na₂CO₃(80:20)提取。同时提取样品时对样品分别浸泡、超声处理和加热回流处理,实验结果表明以上条件下,三者结果无明显差异,为保证提取完全,故规定实验中样品提取方式为浸泡30 min、超声提取20 min。

实验中比较了ESI正离子和负离子条件下获取的信息。在正离子条件下,噪音的水平相对较高,且蒽醌类成分未被检出;负离子检测结果优于正离子,且在-3.0 kV时具有较高的信噪比。

从图2上看,若只考虑《中国药典》2010年版的要求,对大黄检测5个游离蒽醌总量,各地大黄均未显示出明显差异。综合考察7类特征成分时,各产地间大黄却随指标成分不同而显示出差异。除四川野生大黄各指纹成分具显著优势外,比较蒽醌苷类的量,结果为四川>青海>甘肃;而比较没食子酰基糖苷类和二苯乙烯苷类成分的量时,结果为青海>四川>甘肃,这同时提示青海地区大黄可能在改善肾功能、胃肠道保护、降脂等方面的药效优于其他地区。该结果亦提示若是以泻下为目的,则推荐选择青海地区产大黄药材,而若是以治疗高血脂症为目的时,使用四川地区产大黄药材将可能呈现最佳的药效。这些都将会为复方制剂中大黄药材基源选择提供依据。

本实验建立了HPLC-DAD-MS大黄药材质量评价方法,并对特征成分的量进行考察,从这些特征成分的量可以来推算药材的量效关系,可以预测不同产地的大黄药材之间的质量差异。但由于现有的标准物质仍较少,不能完全涵盖大黄HPLC图谱中所有特征峰,HPLC-DAD-MS只能够推测特征峰的信号归属,并以母核结构计算各类成分的相对量,有一定不严谨之处。下一步工作将会以分离和确定

各个特征峰成分结构为重点,并同时扩大大黄产区的药材样本量,尤其是青海和甘肃地区典型样本的采集,以达到全面且准确地评价全国道地产区大黄药材质量的目的。而在此基础上,如果进一步开展谱效学研究,尤其是从药材到炮制品的物质基础变化所产生的药效差异,可使中药质量与其药效真正结合起来,有助于阐明中药作用机制,完成谱-量学向谱-效学研究的跨越^[14]。

致谢:本实验所用20批药材之大部分均系作者亲自前往道地产区采挖,在此特别鸣谢成都新荷花中药饮片有限公司刘震东副总经理及该公司所属大黄药材种植基地的大力协助。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2010.
- [2] Wang X Y, Cai S G, Wu Y F, *et al.* Inhibition of Emodin on LPS-induced Nitric Oxide Generation by Suppressing PLC- γ Phosphorylation in Rat Peritoneal Macrophages[J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(3): 189-194.
- [3] 祁红. 大黄的抗炎作用[J]. *中草药*, 1999, 30(7): 522-524.
- [4] 高亮亮, 许旭东, 南海江, 等. 唐古特大黄化学成分研究[J]. *中草药*, 2011, 42(3): 443-446.
- [5] 徐庆, 覃永俊, 苏小建, 等. 掌叶大黄化学成分研究[J]. *中草药*, 2009, 40(4): 533-536.
- [6] 刘庆增. 大黄的化学成分及药理作用[J]. *中草药*, 1987, 18(1): 41-42.
- [7] 南海江, 许旭东, 陈士林, 等. 大黄属植物研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2009, 21: 690-701.
- [8] Komatsu K, Nagayama Y, Tanaka K, *et al.* Development of a high performance liquid chromatographic method for systematic quantitative analysis of chemical constituents in *Rhubarb* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2006, 54(7): 941-947.
- [9] 刘翠玲, 刘东辉, 黄月纯, 等. 大黄饮片 HPLC 指纹图谱的方法学研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2009, 20(5): 442-445.
- [10] 许风国, 刘颖, 宋瑞, 等. LC-MS/MS 法研究大承气汤与其君药大黄物质基础间的相关性[J]. *中国药科大学学报*, 2008, 39(2): 136-141.
- [11] Jin W, Wang Y F, Ge R L, *et al.* Simultaneous analysis of multiple bioactive constituents in *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. by HPLC coupled to tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(14): 2351-2360.
- [12] 张村, 肖永庆, 李丽, 等. 大黄不同饮片指纹图谱研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2009, 32(2): 118-121.
- [13] 日本药局方 XV[S]. 15 版.
- [14] 罗国安, 梁琼麟, 王义明. 中药指纹图谱-质量评价、质量控制与新药研发[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.